

## MATERIAL FOR MEAT GRAIN

Patent Number: JP2100651  
Publication date: 1990-04-12  
Inventor(s): TAKAGAKI YASUO; others: 01  
Applicant(s):: AJINOMOTO CO INC; others: 01  
Requested Patent:  JP2100651  
Application Number: JP19880251623 19881005  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A23L1/317 ; C12N9/10  
EC Classification:  
Equivalents: JP2556109B2

### Abstract

PURPOSE:To obtain the subject inexpensive material, consisting of a pasty meat material and a transglutaminase, capable of imparting good meat grain texture and useful for cattle meat paste products, such as hamburger steak, shao-mai, 'GYOZA' (fried dumpling stuffed with minced pork) or fried meat cake  
CONSTITUTION:The objective material consisting of a pasty meat material and a transglutaminase. Furthermore, the above-mentioned transglutaminase is preferably contained in an amount of 0.1-1000U based on 1g protein in the afore-mentioned pasty meat material.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## ⑫ 公開特許公報 (A)

平2-100651

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>  
 A 23 L 1/317  
 C 12 N 9/10  
 // A 23 J 3/00

識別記号  
 Z  
 505

庁内整理番号  
 2114-4B  
 7823-4B  
 6712-4B

④公開 平成2年(1990)4月12日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全8頁)

## ⑥発明の名称 肉粒用素材

⑦特 願 昭63-251623

⑧出 願 昭63(1988)10月5日

⑨発明者 高垣 康雄 群馬県邑楽郡大泉町大字吉田1222番地 味の素冷凍食品株式会社冷凍食品開発研究所内

⑩発明者 成川 和枝 群馬県邑楽郡大泉町大字吉田1222番地 味の素冷凍食品株式会社冷凍食品開発研究所内

⑪出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

⑫出願人 味の素冷凍食品株式会社 群馬県邑楽郡大泉町大字吉田1222番地

⑬代理人 弁理士 川口 義雄 外3名

## 明細書

## 1. 発明の名称

肉粒用素材

造する場合、従来、チキンペーストなどの安価な食肉素材が、食肉の代替又は增量などの目的で加えられていた。

## 2. 特許請求の範囲

## 〔発明が解決しようとする課題〕

- (1) ベースト状の食肉素材及びトランスグルタミナーゼからなる冷凍肉粒用素材。
- (2) 前記トランスグルタミナーゼが、前記ベースト状食肉素材中の蛋白1gに対して0.11%至1,000U/ml含有されることを特徴とする請求項1の冷凍肉粒用素材。

しかしながら、従来行われていたごく、チキンペーストなどの安価な食肉素材をシューマイ、ハンバーグなどの畜肉練製品に単に混合しただけでは最終製品に肉粒感を賦与することは難しく、このため、安価な食肉素材を多量に使用するのは困難であった。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔課題を解決するための手段〕

## 〔利点分野〕

本発明は、このような欠点を解決し、従来使用されているチキンペーストなどの食肉素材を改質して、最終製品に良好な肉粒感を賦与することができる新規肉粒用素材を開発すべくなされたものである。

本発明はベースト状の食肉素材にトランスグルタミナーゼ (TGase) を作用させることにより得られる新規肉粒用素材に関する。

## 〔従来技術〕

シューマイ、ハンバーグなどの畜肉練製品を製

本発明者等は、アシル転移酵素の一つである

T Gase の、食品蛋白中に多く含有されるグルタミン残基とリジン残基間に架橋を形成する作用に着目し、研究した結果、ペースト状食肉素材を T Gase を用いて改質すると、良好な肉粒感を賦与することが出来る肉粒用素材を安価に製造することができ、これにより安価な食肉素材の多量使用が可能になることを見い出し、本発明を為すに至った。

すなわち、本発明はペースト状の食肉素材及び T Gase からなる冷凍肉粒用素材に関する。

本発明において用いられるペースト状食肉素材としては、骨内分離機で分離した肩肉、エキス抽出後の残渣肉などを摩碎してペースト状にしたもののが使用できる。なお、ペースト状食肉素材は、骨、腱などの付着物を含んでいてもよい。食肉の種類としては、通常食用に供されるものであればよく、牛肉、豚肉、鶏肉、羊肉、馬肉などの畜肉

以下に本発明の冷凍肉粒用素材の製法について説明する。

前記したペースト状の食肉素材に、該食肉素材中の蛋白 1g に対して 0.1乃至 1,000U、好ましくは、1乃至 500U の T Gase を加える。T Gase は粉末のまま加えてもよいが、水溶液にしてから加えるのが、均一に混合しやすいので好ましい。この場合、T Gase 1g を 5~100 倍の水に対して溶解するのが好ましい。モルモット由来の T Gase (MT Gase) はカルシウム ( $Ca^{2+}$ ) 依存性であるが、通常ペースト状食肉素材はカルシウム ( $Ca^{2+}$ ) を含有しているのでカルシウム ( $Ca^{2+}$ ) 蔗を特に添加する必要はない。しかしながら、必要に応じて  $CaCl_2$ 、 $CaCO_3$ 、 $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ などを MT Gase 1U に対して 1~100mM 程度加えてもよい。

を挙げることができる。

本発明において用いられる T Gase の由来は特に限定されるものではなく、食品蛋白中に含まれるグルタミン残基とリジン残基間に架橋を形成し、ペースト状食肉素材に肉粒感を賦与することができるものであれば、いずれも使用することができる。具体的には、例えば、本出願人の一部による特開昭 58-149645 に記載されたモルモット肝由来の T Gase (MT Gase) を挙げることができる。更に、本出願人の一部による特開昭 62-165067 には、微生物、例えば、ストレプトベルチシリウム属の菌により産生される微生物由来の新規な T Gase (BT Gase) が開示されている（新規 BT Gase の製造方法、酵素特性等については後述する）。本発明においては、このような BT Gase をも使用できることは勿論である。

T Gase とペースト状の食肉素材の混合は、通常の手段を用いて行えばよく、例えば、混練機などの搅拌装置を用いて、あるいは、直接手で搅拌混合してもよい。

この場合、肉粒を大きくする目的で、ペースト状食肉素材に対して、0.1~1 % の食塩を混合（塩すり）してもよい。更に、必要に応じて、調味料、香辛料、糖質、多穀類などの通常食用に供される添加物をペースト状食肉素材に加えてもよい。これらの添加物は T Gase と共に加えるのが簡便であるが、必要により別途添加してもよい。

T Gase を添加してよく混合したペースト状食肉素材を、各種用途に応じた適当な容器に充填し、30~60°C で 10 分~2 時間保持し、トランスクルタミナーゼ反応を行わせる。

T Gase は特に失活処理などは不要であるが、酵素反応を停止させて品質を一定に保たせる点で

失活させてもよい。失活は、例えば、80°Cで30分あるいは85°Cで35分程度加熱すればよい。

酵素反応終了後、得られた肉粒用素材を通常の手段を用いて冷凍することにより、本発明の冷凍肉粒用素材を得ることができる。

上述のようにして得られた本発明の冷凍肉粒用素材は、適当な段階にまで解凍し、ミンチ機などによりミンチし、各種畜肉練製品、例えば、ハンバーグ、シューマイなどの原料に加えて使用される。解凍は、ミンチしやすく、且つ、畜肉練製品に良好な肉粒感を賦与することができる程度にまで解凍すればよく、これは使用に際して容易に決めることができる。

本発明の冷凍肉粒用素材は、各種畜肉練製品中の内の代替として又は增量として用いることができる。すなわち、肉と併用してもあるいは肉の代替物として用いてもよい。

トベルチシリウム属の菌により產生されるものである。

#### のB T G a s e の製造

B T G a s e を產生する微生物は、例えば、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム (*S treptoverticillium griseocarneum*) I F O 12776、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (*S treptoverticillium cinnamoneum* sub sp. *cinnamoneum*) I F O 12852、ストレプトベルチシリウム・モバラエンス (*S treptoverticillium nobaraense*) I F O 13819等があげられる。

これら微生物を培養し、トランスクルタミナーゼを取得するための培養法及び精製法等は次の通りである。

培養形態としては、液体培養、固体培養いずれも可能であるが、工業的には深部通気攪拌培養を

以下に本発明で用いる新規B T G a s eについて述べる。

(本発明で用いる新規トランスクルタミナーゼB T G a s e )

#### (1)トランスクルタミナーゼとその由来

トランスクルタミナーゼ(以下、T G a s e と略称することがある。)は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基のアーカルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。このT G a s e は、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基のε-アミノ基が作用すると、分子内及び分子間にε-(ア-G I U)-L Y S 架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

本発明で使用する新規トランスクルタミナーゼ(B T G a s e )は、微生物、例えば、ストレプ

行うのが有利である。又、使用する培養源としては、一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩及びその他の微量栄養の他、ストレプトベルチシリウム属に属する微生物の利用出来る栄養源であれば全て使用出来る。培地の炭素源としては、ブドウ糖、ショ糖、ラスターーゲン、グリセリン、デキストリン、澱粉等の他、脂肪酸、油脂、有機酸などが単独で又は組合せて用いられる。窒素源としては、無機窒素源、有機窒素源のいずれも使用可能であり、無機窒素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、堿化アンモニウム等が挙げられる。又、有機窒素源としては大豆、米、トウモロコシ、小麦などの粉、糠、脱脂粕をはじめコーンステイーブリカ、ペプトン、肉エキス、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス等が挙げられる。無機塩及び微量元素としては、リン酸、マグネシウム、カリ

ウム、鉄、カルシウム、亜鉛等の金属の他ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等の菌の生育や BTGase の產生を促進するものであれば必要に応じて使用出来る。

培養は好気的条件で、培養温度は菌が発育し BTGase が产生する範囲であれば良く、好ましくは 25~35°C である。培養時間は、条件により異なるが、BTGase が最も产生される時間まで培養すれば良く、通常 2~4 日程度である。

BTGase は液体培養では培養液中に溶解されており、培養終了後培養液より固形分を除いた培養液より採取される。

培養液より BTGase を精製するには、通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。

例えば、エタノール、アセトン、イソプロピルアルコール等の有機溶媒による処理、精安、食塩

する。

BTGase 活性は、特に記載しないかぎり以下に記載する方法により測定した。

#### 〈活性測定法〉

試薬 A 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0)  
0.1M ヒドロキシルアミン  
0.01 M 還元型グルタチオン  
0.03 M ベンジルオキシカルボニル・L-グルタミルグリシン

試薬 B 3N-塩酸  
12% - トリクロロ酢酸  
5% FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (0.1N-HCl に溶解)

上記溶液の 1:1:1 の混合液を試薬 B とする。

酵素液の 0.05 ml に試薬 A 0.5 ml を加えて混和し 37°C で 10 分間反応後、試薬 B を加えて反応停止と

等により離析、透析、膜外ろ過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、吸着剤、等電点分画等の方法が使用出来る。又、これらの方針を適当に組合せる事により BTGase の精製度が上の場合は適宜組合せて行う事が出来る。これらの方法によって得られる酵素は、安定化剤として各種の金属、飼料、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え或いは加えることなく、膜外ろ過濃縮、逆浸透濃縮、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥の方法により液状又は固形の BTGase を得ることが出来る。

BTGase の活性測定はベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシンとヒドロキシルアミンを基質として Ca<sup>2+</sup> 非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体を形成させ 525nm の吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め活性を算出

FE 誤体の形成を行った後 525nm の吸光度を測定する。対照としてあらかじめ熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵素液のかわりに L-グルタミン酸アーモノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1 分間に 1 ミモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を 1 単位とした。

#### ④ BTGase の酵素特性

上のようにして得られる精製 BTGase 、即ちストレプトベチシリウム・モバランス IFO 13819 のトランスクルタミナーゼ (BTG-1 と命名) 、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム IFO 12776 のトランスクルタミナーゼ (BTG-2 と命名) 、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・ユスピー・シナセ

ネウムIFO 12852のトランスクルタミナーゼ（BTG-3と命名）についての酵素化学的性質は次の通り。

a) 至適pH:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシリルアミンを使用した場合、37°C、10分反応で、BTG-1の至適pHは6~7であり、BTG-2の至適pHは6~7付近にあり、BTG-3の至適pHは6~7付近にある。

b) 至適温度:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシリルアミンを使用した場合、pH6、10分反応で、BTG-1の至適温度は55°C付近であり、BTG-2の至適温度は45°C付近であり、BTG-3の至適温度は45°C付近にある。

ルオキシカルボニルグルタミニルグリシンの場合の反応性は最も高い。この時の各種合成基質温度は5 mMとした。結果は表-1に示される。

なお、表-1中のCBZはベンジルオキシカルボニル基の略であり、Glnはグルタミル基の略であり、Glyはグリシル基の略であり、Aspはアスパラギニル基の略である。

表-1

| 基 質                 | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 |
|---------------------|-------|-------|-------|
| CBZ-Gln-Gly         | %     | %     | %     |
| CBZ-Gln-Gly-OEt     | 100   | 100   | 100   |
| CBZ-Gln-Gln-Gly     | 63    | 44    | 42    |
| CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly | 38    | 39    | 35    |
| CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly | 8     | 12    | 11    |
| CBZ-Gln             | 23    | 58    | 60    |
| CBZ-Asp-Gly         | 0     | 0     | 0     |
| Gly-Gln-Gly         | 0     | 0     | 0     |

c) pH安定性:

37°C、10分間処理で、BTG-1はpH 5~9で安定であり、BTG-2はpH 5~9で安定であり、BTG-3はpH 6~9で安定である。

d) 溫度安定性:

pH7で10分間処理では、BTG-1は40°Cでは88%活性が残存し、50°Cでは74%活性が残存し、BTG-2は40°Cでは86%活性が残存し、50°Cでは56%活性が残存し、BTG-3は40°Cで80%活性が残存し、50°Cでは53%活性が残存する。

e) 基質特異性:

各BTGaseを用い、各種合成基質とヒドロキシリルアミンとの反応を調べた。いずれのBTGaseも合成基質がベンジルオキシカルボニルアスパラギニルグリシン、ベンジルオキシカルボニルグルタミン、グリシルグルタミニルグリシンの場合反応しない。しかし合成基質がベンジ

f) 金属イオンの影響:

活性測定系に1 mM濃度になるように各種金属イオンを加えて影響を調べた（結果は表-2に示される）。いずれのBTGaseもCu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>により活性が阻害される。

表 - 2

| 金属イオン                                | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| None                                 | 100   | 100   | 100   |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 101   | 102   | 102   |
| BaCl <sub>2</sub>                    | 101   | 99    | 105   |
| CoCl <sub>2</sub>                    | 103   | 103   | 103   |
| CuCl <sub>2</sub>                    | 79    | 82    | 86    |
| FeCl <sub>3</sub>                    | 96    | 104   | 106   |
| KCl                                  | 96    | 99    | 105   |
| MgCl <sub>2</sub>                    | 102   | 104   | 103   |
| MnCl <sub>2</sub>                    | 98    | 97    | 97    |
| NaCl                                 | 99    | 102   | 101   |
| NiCl <sub>2</sub>                    | 102   | 100   | 101   |
| Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> | 97    | 97    | 100   |
| SrCl <sub>2</sub>                    | 100   | 101   | 100   |
| ZnCl <sub>2</sub>                    | 15    | 24    | 24    |

## d) 阻害剤の影響:

各阻害剤を 1 mM になるように加え、25°C、30 分放置後、活性を測定した（結果は表 - 3 に示される）。いずれの BTGase もバラクロロマーキュリー-安息香酸（PCMNB と略する）、N-エチルマレイミド（NEM と略する）、モノヨード酢酸により活性が阻害される。

表 - 3

| 阻害剤     | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 |
|---------|-------|-------|-------|
| None    | 100   | 100   | 100   |
| EDTA    | 102   | 98    | 99    |
| PCMNB   | 54    | 61    | 63    |
| NEM     | 5     | 5     | 3     |
| モノヨード酢酸 | 64    | 50    | 67    |
| PMSE    | 104   | 95    | 101   |

表 - 3 中 PMSE はフェニルメチルスルホニルフルオライドの略である。

## h) 等電点:

アンボライン等電点電気泳動により求めたところ、BTG-1 の等電点 pH は 9.1 付近であり、BTG-2 の等電点 pH は 9.7 付近であり、BTG-3 の等電点 pH は 9.8 付近である。

## i) 分子量:

SDS ディスク電気泳動法により求めたところ、BTG-1 の分子量は約 38,000 であり、BTG-2 の分子量は約 41,000 であり、BTG-3 の分子量は約 41,000 である。

## (ii) BTGase の製造例

## a) BTG-1 の製造

ストレアトベルチシリウム・モバラエンス I F O 13819 を培地組成ポリベブトン 0.2%、グリコース 0.5%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1% からなる培地 (pH 7) 200 ml に接種し、30°C、48 時間培養し、得られた 培養液を

ポリベブトン 2.0%、ラスターゲン 2.0%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1%、酵母エキス 0.2%、消泡剤としてアデカノール（商品名、旭電化社製品）0.05% からなる培地 20 L (pH 7) に加え 30°C で 3 日間培養後ろ過し、培養液 18.5 L 得た。このものの活性は、0.35 u/ml である。

培養液を塩酸で pH 6.5 に調整し、予め 0.05M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化しておいた CG-50（商品名、オルガノ社製品）のカラムに通した。この操作でトランスクルタミナーゼは吸着された。さらに同緩衝液で不純蛋白質を洗い流した後、さらに 0.05~0.5 M の同緩衝液の濃度勾配をつくり、通液して溶出液を分画回収し、比活性の高い分画を集めた。電導度を 10 ms 以下になるように希釈後ブルーセファロースのカラムに通した。この操作でトランスクルタミナーゼは吸着された。更に

0.05M リン酸緩衝液(pH 7)で不純蛋白質を洗い流した後、0~1Mの食塩濃度勾配をつくり通液して溶出液を回収し比活性の高い画分を集めた。UF6000膜を使い濾縮し、0.5Mの食塩を含む0.05Mリン酸緩衝液(pH 7)で緩衝液を用いて平衡化させた。

得られた濾縮液を同緩衝液で予め平衡化しておいたセファデックスG-75(ファルマシアファインケミカル社製)を含むカラムに通し、同緩衝液を流して溶出液を分画した。この結果活性画分は単一のピークとして溶出された。このものの比活性は、培養液に対し625倍であり、回収率は47%であった。

#### b) BTG-2の製造

BTG-1の場合と同様にして、ストレブトペルチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776を30°Cで3日間培養後ろ過し、培養液19Lを得た。

水10Lに溶解した液を添加し、混練機にて充分に搅拌した。これを四角いステンレス製容器に入れ、50°Cで1時間保持した後冷却し凝結した。このものを解凍後ミンチし、これを用いて下記配合のチキンハンバーグを作製した。このチキンハンバーグは、BTGase-1を添加していないチキンペーストを用いて作製したチキンハンバーグよりも肉質感、ジューシー感にとみ、より本物の肉らしい食感を示した。官能評価結果(官能検査員10名)を下記表に示した。

#### <ハンバーグの配合>

|                        |      |     |
|------------------------|------|-----|
| B TGase-1含有<br>チキンペースト | 60.0 | 重量部 |
| 玉葱                     | 20.0 |     |
| 卵                      | 6.9  |     |
| 牛乳                     | 6.9  |     |
| パン粉                    | 5.0  |     |
| 食塩                     | 1.0  |     |

このものの活性は0.28U/Lであった。

BTG-1の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

#### c) BTG-3の製造

BTG-1の場合と同様にして、ストレブトペルチシリウム・シナモネウム・リブ・エスピー・シナモネウムIFO 12852を30°Cで3日培養後ろ過し、培養液18.5Lを得た。このものの酵素活性は0.5U/Lであった。

BTG-1の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

以下に本発明の実施例について述べる。

#### 実施例1

鶏の骨付き肉内を摩碎したチキンペースト1kgに食塩5gを添加し混練機にて5分間高速で搅拌した。しかるのちにBTGase-1 1g(チキンペースト中の蛋白1gに対して約20Uに相当)

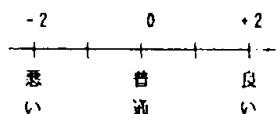
|      |     |
|------|-----|
| コショウ | 0.1 |
| ナツメグ | 0.1 |

更に、BTGase-1含有チキンペーストの代りにBTGase-1を含有しないチキンペースト、鶏肉ミンチをそれぞれ用いて作製したチキンハンバーグの官能評価結果(官能検査員10名)を示した。

#### 官能評価結果

| 評価項目            | B TGase-1含有<br>チキンペースト | B TGase-1非含有<br>チキンペースト | 鶏肉ミンチ |
|-----------------|------------------------|-------------------------|-------|
| 1. 肉質感の好ましさ*    | +1.0                   | -1.0                    | +1.5  |
| 2. ジューシー感の好ましさ* | +1.0                   | 0                       | +1.0  |
| 3. 食感全体の好ましさ*   | +1.0                   | -1.0                    | +1.5  |
| 4. 総合評価**       | 7                      | 3                       | 9     |

## ・評点尺度



## \*\*10点法

0 ~ 5 ~ 10  
まずい 普通 おいしく

## 実施例2

チキンペーストに食塩を添加しなかったこと以外は実施例1と同じ条件で処理して BTGase -1 を含有するチキンペーストの肉粒用素材を得た。解凍後ミンチして、これを用いてチキンシューマイを作製した。このチキンシューマイは、 BTGase -1 を含有しないチキンペーストを用いて作製したチキンシューマイよりも肉粒感、ジューシー感にとみ、より本物の肉らしい食感を示した。

## [発明の効果]

本発明の冷凍肉粒用素材は安価で且つ良好な肉粒感を賦与することができるので、ハンバーグ、シューマイ、ギョーザ、メンチカツなどの畜肉練製品に多量に用いることができる。

出願人(株)味の素株式会社  
出願人味の素冷凍食品株式会社  
代理人弁理士川口義雄  
代理人弁理士中村至  
代理人弁理士船山武  
代理人弁理士箱越正夫